

Title	がん促進性分泌型亜鉛要求性酵素の亜鉛トランスポーター複合体を介した活性化過程に関する解析( Abstract_要旨 )
Author(s)	辻, 徳治
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2017-03-23
URL	<a href="https://doi.org/10.14989/doctor.k20526">https://doi.org/10.14989/doctor.k20526</a>
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（生命科学）	氏名	辻 徳治
論文題目	がん促進性分泌型亜鉛要求性酵素の亜鉛トランスポーター複合体を介した活性化過程に関する解析		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>亜鉛は生体にとって必須の微量金属元素である。亜鉛の重要な機能の一つが酵素タンパク質の補因子としての機能であり、亜鉛が触媒活性に必須の役割を果たしている酵素は亜鉛要求性酵素と総称される。亜鉛要求性酵素は、細胞内外における様々な生体反応を司っており、これら酵素の活性を適切に制御することが、生命活動を維持する上で非常に重要となる。</p> <p>細胞外領域で機能する分泌型亜鉛要求性酵素は、小胞体やゴルジ体からなる早期分泌経路において亜鉛を獲得し、酵素活性を呈するようになると考えられている。実際に、分泌型亜鉛要求性酵素の一つである tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) の活性化過程には、早期分泌経路で機能する二つの亜鉛トランスポーター複合体、zinc transporter 5 (ZNT5)-ZNT6 ヘテロ複合体及び ZNT7 ホモ複合体が、TNAP タンパク質の酵素活性発現に必須の役割を果たすことが明らかとなっている。一方で、TNAP 以外の分泌型亜鉛要求性酵素の活性化過程に関してはほとんど明らかとされておらず、ZNT 複合体の寄与についても不明であった。そこで、分泌型亜鉛要求性酵素の中でも、がん細胞の生存・増殖・浸潤能の亢進に寄与するため、がん治療の標的因子として注目を集める autotaxin (ATX)、matrix metalloproteinase 9 (MMP9)、carbonic anhydrase IX (CAIX) の 3 つに着目し、これら酵素の活性化過程における ZNT 複合体の役割について解析を実施した。</p> <p>ニワトリ DT40 細胞野生株 (WT 株) と <i>znt5</i>, <i>znt6</i>, <i>znt7</i> 三重欠損株 (TKO 株) に ATX、MMP9、CAIX の各酵素を安定発現させ、活性に違いが生じるかを検証した。結果、ATX 活性は TNAP 活性と同様、TKO 株において顕著に低下し、ZNT5-ZNT6 複合体及び ZNT7 複合体が ATX の活性発現に寄与することが示された。また、DT40 細胞から細胞外に分泌された MMP9 の活性は、TNAP や ATX の活性と同様、TKO 株において顕著に低下した。この MMP9 活性の低下は、培養液中に分泌された MMP9 タンパク質の発現量と相関しており、ZNT5-ZNT6 複合体及び ZNT7 複合体が MMP9 の活性発現や分泌過程に寄与していることが示唆された。これに対して、TKO 株に発現させた CAIX の活性は低下せず、CAIX の活性化過程には ZNT5-ZNT6 複合体と ZNT7 複合体以外の ZNT 複合体が関与する可能性が考えられた。CAIX の活性化過程に関与する ZNT 複合体を特定するため、DT40 細胞において早期分泌経路への局在が確認された ZNT4 ホモ複合体に着目して解析を進めた結果、TKO 株から更に <i>znt4</i> を欠損させた <i>znt4</i>, <i>znt5</i>, <i>znt6</i>, <i>znt7</i> 四重欠損株 (QKO 株) で CAIX 活性が有意に低下した。低下した CAIX 活性は、ZNT4 複合体の再発現のみならず、ZNT5-ZNT6 複合体の再発現ならびに ZNT7 複合体の再発現により回復した。これらの結果から、CAIX の活性発現には、上記いずれか一つの ZNT 複合体を介して輸送された亜鉛が必要であることが明らかとなった。</p> <p>本研究の結果から、ZNT5-ZNT6 複合体及び ZNT7 複合体が、がん促進性分泌型亜鉛要求性酵素である ATX、MMP9、CAIX の活性化過程に寄与すること、さらに、CAIX の活性発現には ZNT5-ZNT6 複合体、ZNT7 複合体に加え、ZNT4 複合体が寄与することが明らかとなり、分泌型亜鉛要求性酵素の活性化過程の制御に関わる ZNT 複合体の役割についての新たな知見が提示された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

細胞外領域で機能する分泌型亜鉛要求性酵素は、早期分泌経路において亜鉛を獲得し、酵素活性を呈する。しかしながら、この過程についての解析はほとんど進展しておらず、tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP)の活性発現に、早期分泌経路で機能する ZNT5-ZNT6 ヘテロ複合体及び ZNT7 ホモ複合体が必須の役割を果たすこと以外ほとんど明らかにされていない。本研究は、がん治療の標的因子としても注目を集める 3 つの分泌型亜鉛要求性酵素 autotaxin (ATX)、matrix metalloproteinase 9 (MMP9)、carbonic anhydrase IX (CAIX)の活性発現に機能する ZNT 複合体について解析した結果をまとめたものであり、以下のような知見を得ている。

- 1) ニワトリ DT40 細胞野生株 (WT株)と *znt5*, *znt6*, *znt7* 三重欠損株 (TKO株)に ATX を安定発現させ、ATX 活性が TNAP 活性と同様、TKO 株において顕著に低下し、ZNT5-ZNT6 複合体及び ZNT7 複合体が ATX の活性発現に寄与することを示した。
- 2) WT 株と TKO 株に MMP9 を安定発現させ、細胞外に分泌された MMP9 活性が TKO 株において顕著に低下することを示した。また、この MMP9 活性の低下が、培養液中に分泌された MMP9 タンパク質の発現量と相関することを示し、ZNT5-ZNT6 複合体及び ZNT7 複合体が MMP9 の活性発現や分泌過程にも寄与することを示した。
- 3) 同様に安定発現させた CAIX においては、TKO 株においても活性低下がみとめられないことを示し、CAIX の活性発現には、TNAP や ATX の場合と異なり、ZNT5-ZNT6 複合体と ZNT7 複合体以外の ZNT 複合体が関与することを明らかにした。
- 4) TKO 株から更に *znt4* を欠損させた *znt4*, *znt5*, *znt6*, *znt7* 四重欠損株 (QKO 株) を作成して、CAIX 安定発現株を樹立し、QKO 株においては、CAIX 活性が有意に低下することを明らかにした。また、低下した CAIX 活性は、ZNT4 複合体の再発現のみならず、ZNT5-ZNT6 複合体の再発現ならびに ZNT7 複合体の再発現により回復することを示し、CAIX の活性発現には、上記いずれか一つの ZNT 複合体を介して輸送された亜鉛が必要であることを明らかにした。

以上のように、本研究は、がん促進性の分泌型亜鉛要求性酵素に着目し、その活性化過程の制御に関わる ZNT 複合体の役割についての新たな知見を示した成果として、生化学分野に大きく貢献するものである。また、記載内容からも、申請者は生命科学に関する高度で幅広い知識、専攻分野における優れた研究能力を有し、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見と概念を提示していると判断できる。そして、本論文は、論理的かつ一貫性をもって記述されていた。よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

また、平成 29 年 1 月 26 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日：                      年                      月                      日